

## Optimasi Produksi dan Karakterisasi Sistem Selulase dari *Bacillus circulans* strain Lokal dengan Induser Avicel

### *Production Optimization and Cellulose System Characterization of Bacillus circulans Local Strain Using Inducer Avicel*

Evi Susanti

Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Negeri Malang

#### ABSTRACT

Exploration of aerobic bacteria which can produce cellulase system is very important to discover potential cellulase resource which can hydrolysis lignocellulose waste into glucose. The aimed of this researched were determine optimum condition of cellulase system production in Berg's media with avicel as inducer and it's characterization. *Bacillus circulans* local strain from laboratory of Microbiology ITB produced consist of CMC-ase (111.11 U/mL) and avicelase (55.56 U/mL) in Berg's medium contain 0.5% avicel, pH = 9.0 and 5 days of incubation. Characteristic of this cellulase system were: (1) optimum level of CMC-ase (129.97 U/mL) and avicelase (87.96 U/mL) was obtained at pH= 7.0, temperature 50°C and 2 hours incubation, (2) Vmaks and Km of CMC-ase was 1000 µg glucose/hour and 5%, Vmaks and Km of avicelase was 200 µg glucose/hour and 1.2%, (3) capable of hidrolizing sugarcane, corn cob and rice bran during optimum condition and released glucose 262 ppm, 81 ppm and 78 ppm. This research encouraged that *Bacillus circulans* capable of producing cellulase system with high activity and suggested to degradated lignocelluloses as feedstocks of bioetanol.

Keyword: Cellulase system, *Bacillus circulans*, avicel

#### PENDAHULUAN

Indonesia sebagai negara agraris setiap tahunnya menghasilkan limbah lignoselulosa yang sangat melimpah. Limbah lignoselulosa tersebut berupa jerami, sekam padi, bonggol jagung, klobot jagung, ampas tebu, serbuk gergaji, tandan kosong kelapa sawit dan sabut kelapa. Hidrolisis sempurna senyawa lignoselulosa sebagian besar menghasilkan glukosa yang merupakan bahan dasar bagi industri fermentasi seperti bioetanol. Potensi ini terkendala dengan sifat lignoselulosa yang sulit untuk didegradasi. Salah satu penyebab sulitnya lignoselulosa didegradasi adalah struktur kristalin dari selulosa yaitu komponen utama penyusun lignoselulosa pada tanaman (Koesnandar 2008). Selulosa merupakan polimer linier dari glukosa yang terikat melalui ikatan glikosidik  $\beta$  -1 $\rightarrow$ 4. Panjang satu rantai selulosa antara 2000 –14,000 residu. Ikatan hidrogen intra- dan intermolekuler antar rantai dalam serat selulosa mengakibatkan selulosa memiliki struktur kristalin yang padat dan rapat (Chapli 2007). Di alam, sebagian besar selulosa (90-96%) didegradasi secara aerob dan hanya sebagian kecil didegradasi

secara anaerob (Alam 2004). Hal ini mencirikan bahwa di alam banyak mikroba aerob yang dapat mendegradasi selulosa. Biokonversi selulosa menjadi glukosa merupakan proses yang komplek yang memerlukan selulase dengan beragam aktivitas. Dari sudut pandang industri, produksi enzim selulase ekstraselular yang memiliki beragam aktivitas atau selanjutnya didefinisikan sebagai sistem selulase sangat diperlukan khususnya yang memiliki aktivitas CMC-ase dan avicelase (Alam 2004). Oleh sebab itu, eksplorasi mengenai bakteri aerob yang dapat memproduksi sistem selulase sangat penting untuk memecahkan kendala tersebut. Spesies *Bacillus* khususnya *Bacillus circulans* memiliki beberapa keunggulan sebagai sumber sistem selulase yaitu tidak bersifat patogen, mudah ditumbuhkan, media pertumbuhannya murah dan menghasilkan sistem selulase dengan aktivitas yang tinggi (Robson & Glen 1984, Waenukul & Ratanakhanokchai 2007). Tujuan penelitian ini adalah menentukan kondisi optimum produksi sistem selulase dari *Bacillus circulans* strain lokal dengan inducer avicel dan karakterisasi sistem selulase yang dihasilkan.

## METODE

### Optimasi produksi sistem selulase dari *Bacillus circulans*

Optimasi pH untuk produksi sistem selulase dari *Bacillus circulans*

*Bacillus circulans* yang digunakan berasal dari koleksi biakan murni Laboratorium Mikrobiologi ITB. Media yang digunakan adalah medium garam mineral Berg, yang mengandung avicel sebagai sumber karbon, pada kondisi aerob. Tahapan kerja yang dilalui: sebanyak 1 ose *B. circulans* diinokulasi ke 10 mL media NC, diinkubasi selama semalam pada suhu 37°C dan 100 rpm sehingga diperoleh larutan stater. Sebanyak 2 mL stater diinokulasi dalam masing-masing 100 mL media garam mineral Berg cair yang mengandung 0,5% avicel yang memiliki pH 5,0; 7,0; 9,0 dan 10,0. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C dan 85 rpm. Pada hari ke-3, 5 dan 7, sebanyak 6 mL media pertumbuhan yang diambil secara aseptik dan disentrifugasi 3000 rpm selama 20 menit. Sentrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar sistem selulase, ditentukan kadar protein, aktivitas CMC-ase dan Avicelase.

Optimasi konsentrasi avicel untuk produksi sistem selulase *Bacillus circulans*

Sebanyak 2 mL stater diinokulasi dalam masing-masing 100 mL media garam mineral Berg cair pada pH optimum yang mengandung avicel dengan variasi 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% dan 0,5%. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C dan 85 rpm. Pada hari kelima, media pertumbuhan disentrifugasi 3000 rpm selama 20 menit. Sentrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar sistem selulase, ditentukan kadar protein, aktivitas CMC-ase dan Avicelase.

### Penentuan kadar protein dengan metoda Lowry

Sebanyak 0,5 mL sampel protein yang mengandung 0 (kontrol), 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 µg protein, ditambahkan 5 mL pereaksi Biuret (campuran dari 4,9 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, 0,05 mL natrium kalium tataratrat 2,7% dan 0,05 mL CuSO<sub>4</sub> 1%), aduk homogen. Inkubasi pada suhu kamar tepat 10 menit. Tambahkan 0,5 mL Folin Ciocalteu 1N. Inkubasi pada suhu kamar tepat 30 menit. Nilai absorbansinya diukur pada panjang gelombang 700 nm. Data yang diperoleh digunakan untuk menentukan kurva standar protein yang merupakan kurva hubungan antara konsentrasi protein dengan nilai absorbansinya pada panjang gelombang 700 nm. Penentuan kadar protein dalam sampel dilakukan dengan memberlakukan yang sama.

### Uji aktivitas CMC-ase (Alam 2004)

Sebanyak 2 mL CMC 1% dalam buffer fosfat 0,1 M pH 7,0 dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 1 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7,0, ditambah 2 mL ekstrak kasar enzim, diinkubasi 45°C selama 120

menit. Jumlah glukosa yang dihasilkan ditentukan dengan metode Somogy-Nelson.

### Uji aktivitas avicelase (Alam 2004)

Prosedur sama dengan uji aktivitas CMC-ase, tetapi substrat diganti dengan avicel 1% dalam buffer fosfat 0,1 M pH 7,0.

### Penentuan kadar glukosa dengan metode Somogy-Nelson

Sebanyak 1 mL sampel glukosa yang mengandung glukosa 0 (kontrol), 10, 30, 50, 70, 90, 110 ppm, ditambahkan 1 mL pereaksi Nelson aduk homogen. Campuran dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 20 menit. Setelah dingin, ditambahkan 1 mL pereaksi arsenomolibdat dan akuades sebanyak 7 mL. Nilai absorbansi dilakukan pada 540 nm. Data yang diperoleh digunakan untuk menentukan kurva standar glukosa yaitu hubungan antara konsentrasi glukosa dengan nilai absorbansi pada 540 nm. Penentuan kadar glukosa dalam sampel dilakukan dengan memberi perlakuan yang sama.

### Karakterisasi sistem selulase

#### Penentuan pH optimum aktivitas sistem selulase

Sebanyak 10 buah tabung reaksi, 5 tabung masing-masing diisi dengan 2,0 mL substrat avicel 1 % (b/v) dan 5 tabung yang lain masing-masing diisi dengan 2,0 mL substrat CMC 1 % (b/v), dengan pH yang telah diatur sebelumnya, yaitu pH 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 dan 9,0. Selanjutnya ditambahkan 2,0 mL ekstrak kasar sistem selulase dan 1,0 mL buffer pospat pH 6,0; 7,0; 8,0; 9,0. Tiap campuran ini diinkubasi pada temperatur 45°C dan diinkubasi selama 120 menit. Setelah selesai diinkubasi, untuk menghentikan hidrolisis, tabung dimasukkan dalam air es sampai temperatur 4°C. Kadar gula pereduksi tiap tabung dianalisis secara spektrofotometri menggunakan reagen Somogyi-Nelson.

#### Penentuan waktu inkubasi optimum aktivitas sistem selulase

Untuk menentukan temperatur optimum dilakukan uji aktivitas ekstrak kasar sistem selulase pada pH optimum yang diperoleh pada percobaan sebelumnya. Waktu inkubasi divariasi selama (120; 180; 240; 300) menit.

#### Penentuan temperatur optimum aktivitas sistem selulase

Untuk menentukan temperatur optimum dilakukan uji aktivitas ekstrak kasar sistem selulase pada pH dan waktu inkubasi optimum. Suhu inkubasi divariasi pada suhu kamar; 35; 40; 45; 50; dan 55°C.

### Penentuan nilai Km dan Vmaks

Harga Vm dan Km ditentukan melalui uji aktivitas ekstrak kasar sistem selulase dengan substrat avicel dan CMC pada pH, temperatur dan waktu inkubasi optimum yang diperoleh pada percobaan sebelumnya. Variasi konsentrasi substrat avicel dan

CMC sebesar (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0)% (b/v). Data hasil yang diperoleh digunakan untuk menentukan  $K_m$  &  $V_{maks}$  melalui kurva Lineawer-Burk ( $1/[S]$  versus  $1/v$ ).

#### Aktivitas sistem selulase pada berbagai substrat lignoselulosa

Substrat lignoselulosa dipotong kecil-kecil, dicuci beberapa kali dengan air panas untuk menghilangkan glukosa terlarut. Masing-masing sebanyak 0,1 g substrat dihidrolisis dengan 4 mL ekstrak kasar sistem selulase dan 6 mL buffer fosfat pH 7,0, suhu 50°C selama 2 jam.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Produksi sistem selulase dari *Bacillus circulans*

Optimasi pH dan waktu inkubasi untuk produksi sistem selulase *Bacillus circulans*. Pertumbuhan bakteri secara umum dapat kita identifikasi melalui kurva pertumbuhannya. Kurva pertumbuhan merupakan suatu kurva yang memperlihatkan hubungan antara waktu pertumbuhan dengan jumlah sel. Jumlah sel bakteri dapat diketahui berdasarkan nilai *optical density* (OD) dengan spektrometri pada panjang gelombang 600 nm. Tetapi pada penelitian ini hal tersebut tidak dapat dilakukan karena sumber karbon yang digunakan yaitu avicel (mikrokristalin selulosa) bersifat tidak larut dalam air, sehingga media pertumbuhannya keruh. Oleh karena itu dilakukan pendekatan dengan mengukur kadar

protein dalam media pertumbuhan untuk mengidentifikasi terjadinya pertumbuhan *Bacillus circulans*, seperti ditunjukkan pada Tabel 1.

Peningkatan kadar protein antara hari ke-0 dan ketiga menunjukkan telah terjadi peningkatan jumlah sel. Hal ini diduga adalah fase adaptasi pertumbuhan *Bacillus circulans*. Menurut Kusnadi *et al.* (2003) fase adaptasi ditandai dengan kenaikan komponen makromolekul seperti protein. Sel mempersiapkan semua perangkat untuk berkembangbiakan selanjutnya termasuk mensintesis berbagai jenis enzim hidrolase ekstraseluler (Brock *et al.* 1986). Sedangkan penurunan kadar protein pada hari ke-5 dan ke-7 tidak dapat dikatakan secara langsung bahwa jumlah sel menurun karena kadar protein hanya mencerminkan besarnya protein ekstraseluler yang dilepas bakteri tersebut.

Penurunan kadar protein ini diduga karena dalam media pertumbuhannya yang miskin, media hanya mengandung mineral dan avicel, bakteri tersebut mendegradasi protein ekstraseluler yang tidak diperlukan seperti protease, lipase serta amilase dan hanya mensintesis protein ekstraseluler yang dibutuhkan saja yaitu selulase. Pemikiran ini didukung oleh sifat ekspresi selulase yang harus diinduksi terlebih dahulu dalam media terbatas yang hanya mengandung sumber karbon selulosa.

Tabel 1. Kadar protein pada berbagai pH media pertumbuhan *Bacillus circulans*.

Perlakuan	Kadar protein ( $\mu\text{g/mL}$ ) pada hari			
	0	3	5	7
pH 5,0	0	142,5	119,5	78
pH 7,0	0	106,5	102	72,5
pH 9,0	0	121,5	103	78,5
pH 10,0	0	112,5	88,5	54,5

Tabel 2. Aktivitas sistem selulase pada berbagai pH media pertumbuhan.

Perlakuan	Sistem selulase	Aktivitas enzim (U/mL) pada hari		
		3	5	7
pH 5,0	CMCase	0	25,69	2,89
	Avicelase	0	252,08	0,00
pH 7,0	CMCase	0	101,39	7,81
	Avicelase	0	0,00	0,00
pH 9,0	CMCase	0	111,81	8,68
	Avicelase	0	59,02	0,00
pH 10,0	CMCase	0	32,64	0,00
	Avicelase	0	0,00	0,00

Uraian diatas juga konsisten dengan pengukuran aktivitas CMC-ase dan avicelase yang dilakukan seperti ditunjukkan pada Tabel 2. Hari ke-3 selulase belum diproduksi oleh bakteri tersebut karena bakteri masih pada fase adaptasi. Setelah fase ini terlampai maka hari ke-5 aktivitas CMC-ase dan avicelase terekspresi dengan baik atau dapat dikatakan bahwa produksi sistem selulase optimum pada hari ke-5. Penurunan yang sangat tajam pada hari ke-7 diduga karena sumber karbon telah berkurang sehingga selulase yang diproduksi juga menurun.

Berdasarkan data pada Tabel 2, maka pH optimum untuk memproduksi sistem selulase dari *Bacillus circulans* strain lokal ini adalah pada pH 9,0 karena pada pH tersebut kedua aktivitas selulase yang menjadi parameter bahwa suatu bakteri telah memproduksi sistem selulase yaitu CMC-ase dan avicelase memiliki aktivitas sama tingginya. Hal ini sesuai dengan karakter *Bacillus circulans* yang merupakan *Bacillus* alkalopilik. Bakteri alkalofil mampu tumbuh pada pH tinggi (basa=alkali). Penelitian ini sejalan dengan penelitian lain yang menyatakan bahwa enzim selulase yang dihasilkan oleh strain *Bacillus* alkalopilik optimal pada rentang pH tinggi yaitu 8,0-11,0 (Horikoshi *et al.* 1984 dan Ferrari *et al.* 1993).

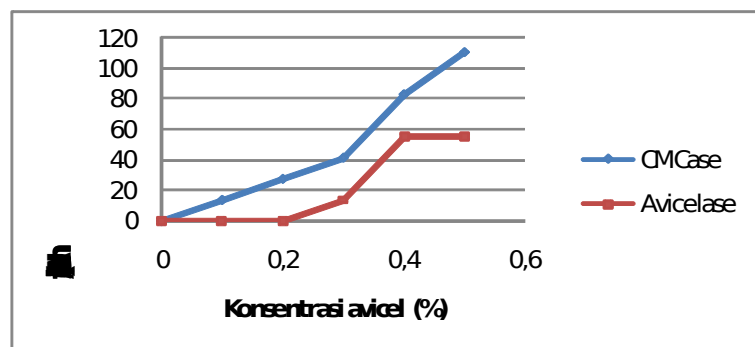
### Optimasi konsentrasi avicel untuk produksi sistem selulase *Bacillus circulans*

Produksi sistem selulase oleh mikroba selulolitik diinduksi oleh sumber karbon kompleks seperti selulosa (Beguín 1994). Jadi, keberadaan sumber karbon sangat penting dalam produksi selulase oleh suatu mikroorganisme. Tabel 3 dan Gambar 1 memperlihatkan aktivitas sistem selulase pada berbagai konsentrasi avicel.

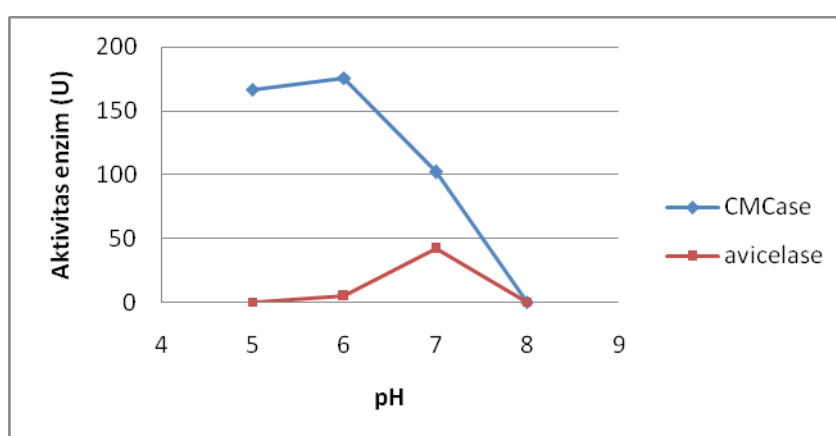
Tabel 3 menunjukkan semakin tinggi konsentrasi avicel semakin besar aktivitas sistem selulase yang dihasilkan. Pada konsentrasi terbesar yang digunakan menghasilkan aktivitas sistem selulase tertinggi yaitu aktivitas CMCase rata-rata sebesar 111,11 U/mL dan avicelase rata-rata sebesar 55,56 U/mL. Sumber karbon dalam medium harus mencukupi untuk kebutuhan sel biomasa dan produksi enzim (Ray *et al.* 2007). Dengan kata lain semakin banyak sumber karbon yang terdapat dalam media pertumbuhan, maka selulase yang diekspresikan akan semakin meningkat. Akan tetapi kelebihan sumber karbon dalam media pertumbuhan juga akan menghambat pertumbuhan sel karena akan mengurangi jumlah oksigen dalam media tersebut. Sehingga akan menurunkan produksi selulase dari mikroorganisme tersebut.

Tabel 3. Aktivitas sistem selulase dalam media pertumbuhan dengan variasi konsentrasi avicel.

Perlakuan (Konsentrasi Avicel)	Sistem selulase	Aktivitas enzim (U/mL) pada hari ke-5
0%	CMC-ase	0,00
	Avicelase	0,00
0,10%	CMC-ase	13,89
	Avicelase	0,00
0,20%	CMC-ase	27,77
	Avicelase	0,00
0,30%	CMC-ase	41,67
	Avicelase	13,89
0,40%	CMC-ase	83,34
	Avicelase	55,56
0,50%	CMC-ase	111,11
	Avicelase	55,56



Gambar 1. Kurva pengaruh konsentrasi avicel dalam media pertumbuhan terhadap aktivitas sistem selulase.



Gambar 2. Kurva pengaruh pH reaksi enzimatis terhadap aktivitas ekstrak kasar sistem selulase.

Tiap mikroba memerlukan jumlah maksimum induser yang berbeda. Penelitian Robson *et al.* (1984) menggunakan hingga 1% (w/v) celobiosa dalam memproduksi selulase dari *Bacillus*. Akhtar (1998) melaporkan, selulase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis* optimum dengan penggunaan 0,5% (w/v) pada berbagai induser yaitu, arabinosa, xilosa, avicel dan CMC. Ariffin *et al.* (2006) menggunakan 1% (w/v) CMC untuk memproduksi selulase dari *Bacillus pumilus* EB3.

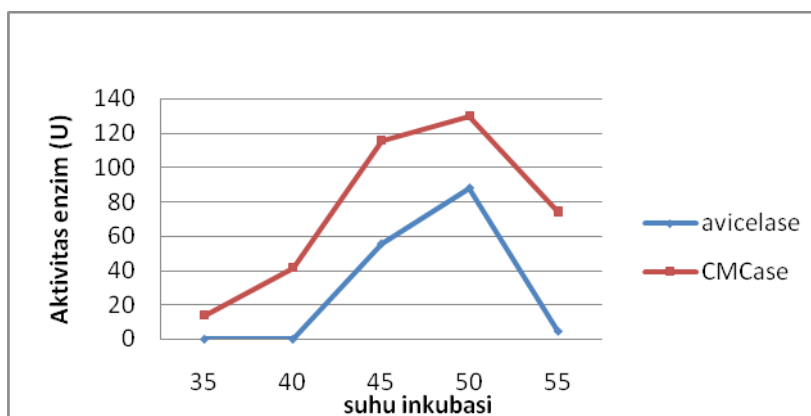
#### Karakterisasi sistem selulase dari *Bacillus circulans*

##### pH optimum aktivitas sistem selulase

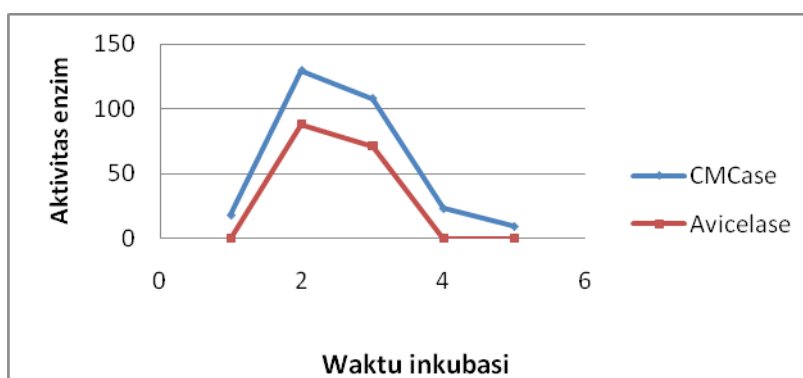
Enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang dapat menghasilkan aktivitas tertinggi dalam mengkatalisis suatu reaksi. Kondisi pH optimum dibutuhkan oleh enzim untuk mengaktifkan seluruh enzim yang mengikat

substrat dan mengubahnya menjadi produk. Pada umumnya enzim hanya aktif pada kisaran pH yang terbatas. Enzim memiliki sisi aktif dengan gugus-gugus tertentu yang berperan sebagai katalis dalam pembentukan kompleks enzim-substrat (ES). Perubahan pH berpengaruh terhadap ionisasi gugus fungsi, yang dapat menyebabkan terjadinya perubahan konformasi enzim selulase dan sifat katalitiknya (Irawadi 1991).

Gambar 2 menunjukkan bahwa aktivitas optimum ekstrak kasar sistem selulase adalah pada pH= 7 dengan aktivitas CMCase rata-rata sebesar 97,22 unit dan aktivitas avicelase rata-rata sebesar 41,67 unit. Satu unit aktivitas ekstrak kasar selulase ini adalah  $\mu$  g glukosa yang dilepas per mL ekstrak kasar enzim (U/mL) per jam waktu inkubasi enzim substrat pada kondisi percobaan (Alam 2004).



Gambar 3. Kurva pengaruh suhu terhadap aktivitas sistem selulase.



Gambar 4. Kurva pengaruh waktu reaksi enzimatik terhadap aktivitas ekstrak kasar sistem selulase.

Hasil ini sejalan dengan penelitian selulase dari *Bacillus* lainnya. Catriona *et al.* (1994) melaporkan bahwa aktivitas selulase yang dihasilkan dari beberapa *Bacillus* optimum pada rentang pH 5.0– 7.0. Immanuel *et al.* (2006) melaporkan bahwa enzim selulase dari *Cellulomonas*, *Bacillus*, and *Micrococcus* spp., menghidrolisis substrat pada rentang pH 4,0 – 9,0, dengan aktivitas maksimum pada pH 7,0.

#### Temperatur optimum aktivitas sistem selulase

Enzim memiliki temperatur optimum dalam melakukan fungsinya, sehingga diperoleh aktivitas enzim maksimum. Gambar 3 menunjukkan bahwa aktivitas optimum ekstrak kasar sistem selulase dicapai pada temperatur 50°C, dengan aktivitas rata-rata CMC-ase sebesar 129,63 unit dan aktivitas rata-rata avicelase sebesar 87,96 unit. Robson *et al.* (1984), Horikoshi (1984), Naz *et al.* (1986), Akhtar (1998) menyatakan suhu optimum

bagi kerja enzim selulase umumnya berkisar antara 40–60°C.

Pengaruh suhu pada aktivitas enzim secara umum ditunjukkan melalui mekanisme kompleks yang melibatkan fenomena berlawanan dari stimulasi dan inaktivasi. Aktivitas mula-mula akan meningkat dengan makin tingginya suhu, namun pada suatu titik tertentu akan terjadi inaktivasi enzim yang akan ditandai dengan menurunnya aktivitas enzim. Susilowati *et al.* (2003) menjelaskan bahwa suhu yang terlalu tinggi dapat mempercepat denaturasi enzim, padahal semakin tinggi suhu semakin aktif enzim tersebut.

Peningkatan suhu menyebabkan aktivitas ekstrak kasar enzim meningkat disebabkan oleh suhu yang makin tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dengan enzim. Tumbukan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks

enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk makin banyak. Pada suhu optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat. Peningkatan temperatur lebih lanjut akan menurunkan aktivitas ekstrak kasar enzim. Hal ini disebabkan karena enzim mengalami denaturasi. Enzim mengalami perubahan konformasi pada temperatur yang terlalu tinggi, sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim (Lakitan 2004).

#### Waktu inkubasi optimum aktivitas sistem selulase

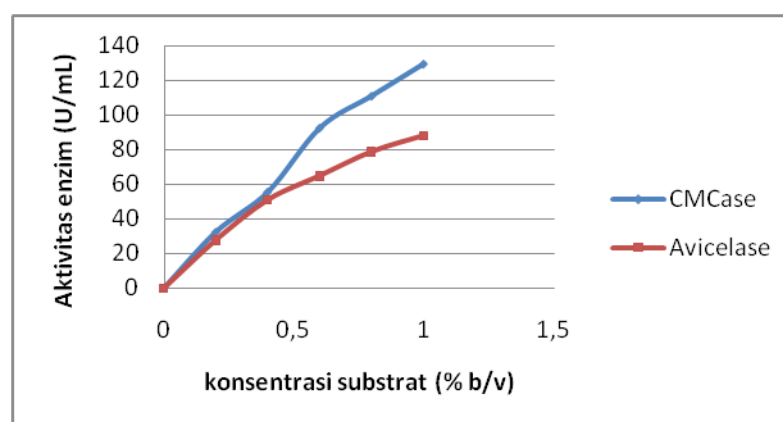
Waktu inkubasi adalah waktu yang dibutuhkan oleh enzim untuk berikatan dengan substrat. Penentuan waktu inkubasi optimum ekstrak kasar sistem selulase dilakukan pada kondisi optimum yang telah diperoleh sebelumnya, yaitu pada pH 7 dan temperatur 50°C. Gambar 4 menunjukkan bahwa aktivitas optimum ekstrak kasar enzim dicapai pada waktu inkubasi 120 menit dengan aktivitas CMCase rata-rata sebesar 129,97Unit/mL dan aktivitas avicelase rata-rata sebesar 87,96Unit/mL.

Penambahan waktu inkubasi akan meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim. Sisi aktif enzim dalam mengikat substrat secara optimum membutuhkan waktu yang cukup. Hal ini diyakini bahwa apabila sisi aktif enzim belum optimal dalam membentuk kompleks enzim-substrat, maka perlu waktu untuk melepas produk. Apabila pada kondisi ini proses enzimatik dihentikan maka produk belum optimal dihasilkan.

Sebaliknya apabila waktu reaksi enzimatik sudah mencapai optimum dalam menghasilkan produk yang maksimum. Aktivitas enzim mengalami penurunan dengan penambahan waktu inkubasi lebih lanjut. Produk gula pereduksi yang dihasilkan dari reaksi enzimatik sebanding dengan lama waktu inkubasi, tetapi jika sisi aktif enzim telah jenuh oleh substrat, maka penambahan waktu inkubasi kurang berpengaruh terhadap jumlah produk, dimana produk yang dihasilkan hanya mengalami peningkatan yang relatif kecil. Tetapi pada penelitian ini terjadi penurunan aktivitas yang sangat tajam setelah jam ke-3, bahkan pada jam ke-5 aktivitasnya mendekati nol. Kondisi ini diyakini karena terjadi denaturasi enzim yang menyebabkan terhentinya proses katalitik. Reaksi enzimatik yang dilakukan pada suhu 50°C selama 5 jam diduga memicu terjadinya proses denaturasi enzim mengingat *Bacillus* termasuk mesophile.

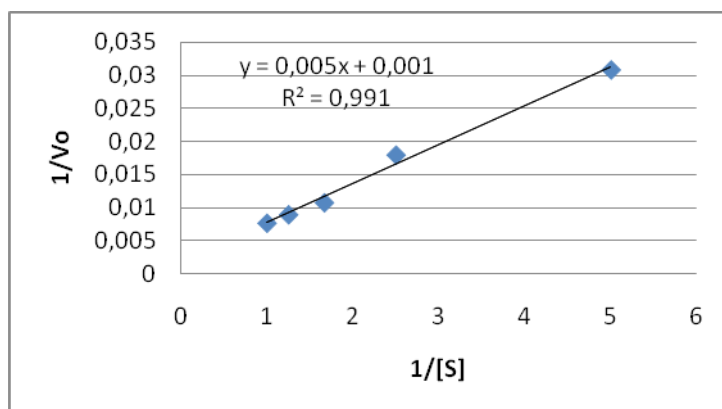
#### Parameter kinetika reaksi enzimatik

Konsentrasi substrat merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Gambar 5 menunjukkan bahwa konsentrasi substrat sebanding dengan aktivitas ekstrak kasar enzim. Pada konsentrasi rendah, aktivitas ekstrak kasar enzim juga rendah, karena sisi aktif enzim hanya sedikit mengikat substrat, sehingga produk gula pereduksi yang dihasilkan juga sedikit. Demikian juga dengan konsentrasi substrat yang makin tinggi, maka sisi aktif enzim akan makin banyak mengikat substrat, sehingga produk gula pereduksi yang dihasilkan juga makin banyak.

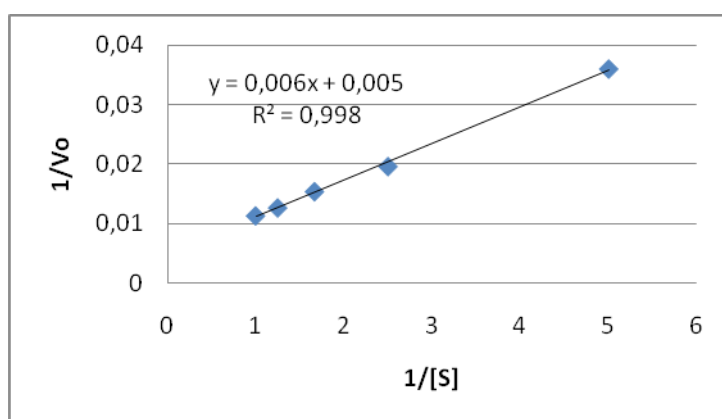


Gambar 5. Kurva hubungan konsentrasi substrat terhadap aktivitas sistem selulase.





(a)



(b)

Gambar 6. Kurva hubungan  $1/[S]$  dengan  $1/V_o$  (a) aktivitas CMC-ase, (b) aktivitas avicelase.

Penambahan substrat lebih lanjut hanya sedikit meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim, karena hampir semua enzim telah membentuk kompleks enzim-substrat, sehingga tidak terdapat lagi sisi aktif enzim yang bebas. Hal ini menunjukkan bahwa sistem selulase yang dihasilkan mengikuti kurva Michaelis-Menten yang mengandung arti bahwa enzim tersebut bukan merupakan enzim alosterik, sehingga data kinetiknya dapat ditentukan melalui persamaan Michaelis-Menten maupun melalui persamaan Lineaer-Burk. Gambar 6 menunjukkan kurva Lineaer-Burk untuk menentukan nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  CMC-ase dan avicelase.

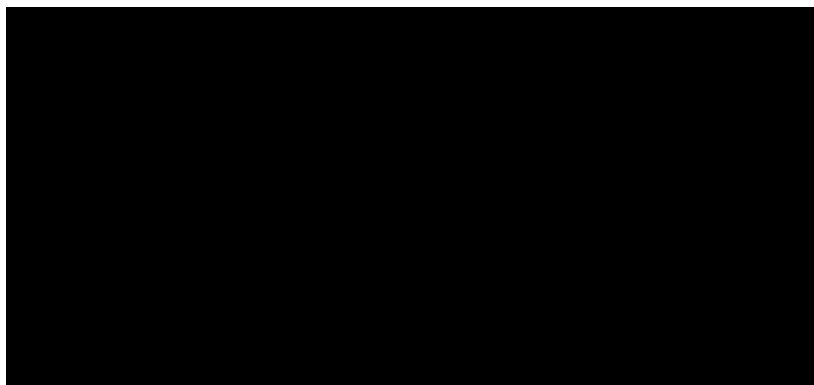
Analisis penentuan nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  dilakukan melalui ekstrapolasi kurva Lineaer-Burk, sehingga diperoleh nilai perpotongan kurva tersebut pada sumbu x dan y. Pada persamaan Lineaer-Burk, perpotongan dengan sumbu x menunjukkan nilai  $-1/K_m$  dan perpotongan dengan sumbu y

menunjukkan nilai  $1/V_{maks}$ . Perpotongan dengan sumbu x untuk CMC-ase dan avicelase sebesar -0,2 dan -0,83 %, sehingga  $K_m$  untuk CMC-ase dan avicelase sebesar 5% dan 1,2%. Perpotongan dengan sumbu y untuk CMC-ase dan avicelase sebesar 0,001 dan 0,005  $\mu\text{g}$  glukosa/jam, sehingga  $V_{maks}$  untuk CMC-ase dan avicelase sebesar 1000 dan 200  $\mu\text{g}$  glukosa/jam. Nilai  $V_{maks}$  dan  $K_m$  masing-masing pada pH=7,0, suhu reaksi 50°C dan waktu reaksi selama 2 jam.

#### Kemampuan sistem selulase menghidrolisis substrat lignoselulosa

Pengujian kemampuan ekstrak kasar selulase untuk menghidrolisis substrat lignoselulosa seperti sekam padi, bonggol jagung dan ampas tebu serta diuji pula terhadap selulosa murni seperti kapas dan kertas saring dilakukan dengan menginkubasi 3 mL ekstrak kasar enzim dengan 0,06 g substrat pada suhu 50°C selama 2 jam.





Gambar 7. Hidrolisis substrat lignoselulosa oleh ekstrak kasar sistem selulase dari *Bacillus circulans* strain lokal dengan inducer avicel.

Hasil yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 7. Tingginya kemampuan hidrolisis yang ditunjukkan terhadap substrat lignoselulosa menunjukkan bahwa ekstrak kasar tersebut mengandung berbagai aktivitas selulase berbeda (Wong dalam Waeonukul, 2007). Sedangkan, pada substrat kapas dan kertas saring relatif rendah karena kedua substrat tersebut merupakan selulosa murni yang struktur antar molekulnya sangat rapat.

### KESIMPULAN

Kondisi optimum produksi sistem selulase dari *Bacillus circulans* strain lokal dalam media Berg pada pH= 5,0 yang mengandung 0,5% avicel selama 5 hari menghasilkan CMC-ase dengan aktivitas 111,11 Unit/mL dan avicelase sebesar 55,56 Unit/mL. Sistem selulase yang dihasilkan memiliki kondisi optimum pada pH = 7,0, suhu 50°C dan waktu inkubasi selama 2 jam dengan aktivitas CMC-ase 129,97 Unit/mL dan avicelase 87,96 Unit/mL. CMC-ase memiliki  $V_{maks}$  1000  $\mu$ g glukosa/jam dan  $K_m$  5%, avicelase memiliki nilai  $V_{maks}$  200  $\mu$ g glukosa/jam dan  $K_m$  1,2%, dan mampu menghidrolisis substrat berlignoselulosa seperti ampas tebu, bonggol jagung dan sekam padi masing-masing melepaskan glukosa sebesar 262, 81 dan 78 ppm/2jam pada kondisi optimum.

### Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan penghargaan setinggi-tingginya kepada DP2M yang mendanai penelitian ini melalui program Hibah Bersaing tahun 2009-2010 berjudul "Optimasi Produksi Bioetanol dari Limbah Ampas Tebu Berbasis Sistem Selulase dari *Bacillus circulans* Strain Lokal" dan kepada Saudara Widji Suhardi dari

Kimia MIPA Universitas Negeri Malang yang membantu selama penelitian dilaksanakan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Akhtar, Muhammad Saleh. 1998. Bioconversion of Cellulosic Materials by the Action of Microbial Cellulases. *Thesis*. Institute of Chemistry University of the Punjab.
- Ariffin H, Abdullah N, Umi K, Shirai Y & Hassan MA. 2006. Production and Characterisation of Cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Engineering and Technology*, **3**(1): 47-53.
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM & Parker J. 1986. *Biology of Microorganism*. Seventh Edition. New York: Prentice-Hall International, Inc.
- Catriona AW, Sheila IM & Thomas MW. 1994. Characterization of a  $\beta$ -D-Glucosidase From the Anaerobic Rumen Fungus *Neocallimastix frontalis* with Particular Reference to Attack on Cello-Oligosaccharides. *J. Biotechnol.* **37**: 217-227.
- Chaplin, Martin, 2007. *Water Structure and Science: Cellulose*, London South Bank University, (online). (<http://www.lsbu.ac.uk/water/>, [diakses 10 Januari 2008])
- Ferrari E, Jarnagin AS & Schmidt BF. 1993. Commercial Production of Extracellular Enzymes. In *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria* ed. Sonenstein AL, Hoch JA & Losick R. : 917-937. Washington, DC: American Society of Microbiology.

- Forgaty, William M. (Editor). 1987. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. London: Applied Science Publishers.
- Horikoshi K, Nakao M, Kurono Y & Sashihara N. 1984. Cellulases of an Alkalophilic *Bacillus* strain Isolated from Soil. *Can. J. Microbiol.* **30**:774-779.
- Koesnandar, Helianti & Nurhayati N.2008. Recent Development in the Bioconversion of Lignocelluloses into Ethanol, *Microbiology Indonesia.* **2**(3): 101-102.
- Kusnadi, Peristiwa A, Syulasmi W. Purwianingsih & Rochintaniawat D. 2003. *Mikrobiologi*. Edisi Revisi JICA-IMSTEP, Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia.
- Lakitan B. 2004. *Dasar-dasar Fisiologi Tumbuhan*. PT Raja Grafindo Persada: Jakarta.
- Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH & Pretorius IS. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **66**(3): 506-577.
- Naz BA, Akhta MW, Malik NN & Sami AJ. 1986. Production of Cellulases by a Newly Isolated Thermophilic *Bacillus*. *Pakistan Journal of Biochemistry* **19**:19-25.
- Ray AK, Bairagi A, Ghosh KS & Sen SK. 2007. Optimization of Fermentation Conditions for Cellulose Production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 Isolated from Fish Gut. *Acta Ichthyol. Piscat.* **37** (1): 47–53.
- Robson, Lori M & Glenn H Chambliss. 1984. Characterization of the Cellulolytic Activity of a *Bacillus* Isolate. *Applied and Environmental Microbiology* : 1039-1046.
- Sudarmadji S, Haryono B & Suhardi. 1997. Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Cetakan keempat. Yogyakarta: Penerbit Liberty.
- Susilowati DN, Rosmimik R, Saraswati R, Simanungkalit DM & Gunarto L. 2003. *Koleksi, Karakterisasi, dan Preservasi Mikroba Penyubur Tanah dan Perombak Bahan Organik*. Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman.
- Waeonukul R, Kyu KL & Ratanakhanokchai K. 2007. Multiple Cellulases and Xylanases from *Bacillus circulans* B6 During Growth on Avicel Under An Aerobic Condition. *Thai Journal of Biotechnology* : 27-32.